

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen zur Verteilung der
Serum-Arylesterase (EC 3.1.1.2)
bei 25 Familien
mittels der photometrischen Methode
von Krisch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Frank Paul
aus Oldenburg i.O.

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen zur Verteilung der
Serum-Arylesterase (EC 3.1.1.2)
bei 25 Familien
mittels der photometrischen Methode
von Krisch

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Frank Paul
aus Oldenburg i.O.

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Professor Dr. E. Rügheimer
Referent : Professor Dr. Dr. M. Geldmacher -
Korreferent : v. Mallinckrodt
Professor Dr. H. -B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.1979

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Problemstellung	7
III.	Experimentelle Untersuchungen	8
	1. Methodik und Untersuchungsmaterial	8
	a) Herstellung der Lösungen	9
	b) Gewinnung des Serums	10
	c) Herstellung der Serumverdünnung	10
	d) Versuchsansatz	10
	e) Messung der Extinktion	11
	f) Berechnung der Aktivität	11
	2. Ergebnisse	12
	a) Präzision der Methode	12
	b) Typeneinteilung	21
	c) Meßergebnisse bei den Familien	21
	d) Zusammenfassung der Meßergebnisse..	27
IV.	Diskussion und Zusammenfassung	28
V.	Literaturverzeichnis	29



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Organische Phosphorsäureester sind stark wirksame Gifte, die für die Insektenbekämpfung große Bedeutung erlangt haben.

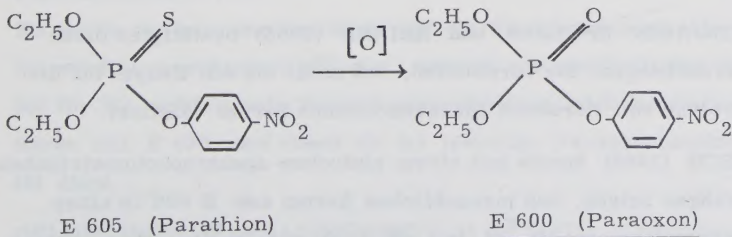
Die weite Verbreitung dieser Pflanzenschutzmittel hatte zur Folge, daß gehäuft Vergiftungen akzidenteller, suizidaler und krimineller Genese mit Phosphorsäureestern auftraten.

Die Wirkung dieser Alkylphosphate bzw. ihrer Metaboliten beruht auf einer Hemmung der Cholinesterase. Dadurch wird der Abbau von körpereigenem Acetylcholin verhindert, der Organismus vergiftet sich selbst:

Statt einer Acetylierung des esteratischen Zentrums der Cholinesterase, wie sie bei der enzymatischen Hydrolyse von Acetylcholin als Zwischenreaktion auftritt, erfolgt eine Phosphorylierung.

Die Dephosphorylierung verläuft nun im Gegensatz zur Deacetylierung so langsam, daß praktisch eine irreversible Enzymschädigung vorliegt.

Eines der bekanntesten Insektizide ist das E 605 (= Parathion = O, O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat). Im Organismus kommt es durch Oxydation zur "Giftung". Es entsteht E 600 (= Paraoxon = O, O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat), ein Hemmstoff der Cholinesterase.



Die $P = O$ -Verbindung unterliegt im Stoffwechsel einer enzymatischen Hydrolyse an der Säure-Anhydridbindung (KOELLE 1963, MAZUR 1946 b, NEAL 1967).

ALDRIDGE (1953) fand im Serum von Ratten, Kaninchen und Pferden ein E 600-spaltendes Enzym. Er teilte die Serumesterasen nach ihrer Hemmbarkeit durch Organophosphate ein in A-Esterase (Aryl- oder Aromatic-Esterase - nicht hemmbar durch Paraoxon) und B-Esterase (Carboxylesterase - hemmbar durch Paraoxon).

Durch vergleichende Untersuchungen stellte er fest, daß das E 600-spaltende Enzym mit der A-Esterase identisch ist.

Schwankungen der Enzymaktivitäten innerhalb der einzelnen Tierarten führte er auf Proteinunterschiede zurück.

MOUNTER und WHITTAKER (1953) bewiesen, daß auch menschliches Serum ein entsprechendes Enzym enthält.

Auch AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (1954), FRIEDBERG und ERDMANN (1959), MAIN (1960) sowie SCHAUMANN und SCHILLER (1960) untersuchten die Serum-Arylesterase eingehend. Die Arylesterase hat nach der internationalen Enzymnomenklatur die Bezeichnung E C 3. 1. 1. 2.

ERDÖS und BOGGS (1961) fanden in der menschlichen Serumfraktion IV-1 und in der Albuminfraktion V Paraoxon-spaltende Enzyme.

SKRINJARIK - SPOLJAR und REINER (1968) bestätigten diese Untersuchungen. Sie vermuteten, daß mehr als ein Enzym für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum existiert.

KRISCH (1968) konnte mit einem einfachen spektrophotometrischen Verfahren zeigen, daß menschliches Serum aus E 600 in einer Konzentration von 10^{-4} M bei pH 11,2 und 25°C p-Nitrophenol

fermentativ abspaltet. P-Nitrophenol dient als Meßgröße und wird durch die Zunahme der Extinktion bei 405 nm quantitativ bestimmt.

KRISCH (1968) fand bei Untersuchungen an Seren von je 25 Männern und Frauen zwei sich überlagernde Gruppen, die sich durch die Höhe der Esteraseaktivität unterschieden.

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT et al. (1969) untersuchten den Vergiftungsgrad der Serumcholinesterase durch E 600 in verschiedenen Konzentrationen. Dabei ergaben sich bei geeigneter E 600-Konzentration entsprechend dem Vergiftungsgrad drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität.

Auch ZÜRCHER (1971) hatte bei der Untersuchung von 619 menschlichen Serumproben mit einem spektrophotometrischen Verfahren, ähnlich der Methode von KRISCH (1968) einen Polymorphismus des Paraoxon-hydrolysierenden Enzyms gefunden.

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT et al. (1972) konnten bei 50 Versuchspersonen eine hochsignifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = + 0,82$) nachweisen zwischen der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon, gemessen mit der Anti-Ch-E-Technik, und der Aktivität der Serum-Paraoxonase, spektrophotometrisch bestimmt nach KRISCH (1968). Dabei entsprach eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraoxonaseaktivität.

Es wurde die Annahme bestätigt, daß die Serumcholinesterase selbst keinen Polymorphismus aufweist, sondern als empfindlicher Indikator für die verbleibende Paraoxonkonzentration nach Inkubation der Seren mit E 600, und damit für die jeweilige Paraoxonaseaktivität dient.

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT et al. (1973) führten nun Un-

tersuchungen an 257 Personen nach der Methode von KRISCH (1968) durch. Sie konnten auch hier drei Gruppen mit unterschiedlicher Aktivität abgrenzen. Dabei unterschieden sich die Mittelwerte der Aktivitäten der einzelnen Gruppen mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit (t-Test), wie aus Tabelle 1 hervorgeht.

Tabelle 1

Serum-Paraoxonase-Aktivität von 257 menschlichen Seren in U/l, gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von KRISCH (1968)
(nach GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al, 1973)

n 257	Gruppe	Paraoxonase-Aktivität (U/l Serum)	
		gemessene Werte	mittlere Aktivität mit Standardabweichung
132	I (1-1)	30-189	97,1 + 36,3
97	II (2-1)	190-350	262,3 + 41,4
28	III (2-2)	> 350	449,6 + 79,4

Eine genaue Zuordnung in den Grenzbereichen ist mit der Methode von KRISCH nicht möglich.

Bei der Untersuchung von 192 Seren mit der Anti-ChE-Technik ergab sich noch eine Aufteilung in drei gut getrennte Gruppen mit unterschiedlicher Serum-Cholinesterase-Restaktivität.

Eine Geschlechtsabhängigkeit der drei Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

Bei Untersuchungen an 35 Familien mit 52 Kindern nach der Anti-ChE-Technik kamen GELDMACHER - v. MALLINCKRODT

et al. (1973) zu dem Ergebnis, daß der Polymorphismus der menschlichen Paraoxonase möglicherweise genetisch determiniert ist und einem einfachen Zwei-Allele-Modell folgt.

Obwohl zur Zeit noch ungeklärt ist, ob die Aktivitätsunterschiede durch quantitative Unterschiede des gleichen Enzymproteins oder durch das Vorliegen verschiedener Enzymproteine bedingt sind und bei etwaigen qualitativen Unterschieden über die jeweilige elektrophoretische Beweglichkeit noch keine Aussage gemacht werden kann (s. JUPAC - JUB - Empfehlungen 1971) wählten GELDMACHER- v. MALLINCKRODT et al. (1973) zur einfachen Darstellung ihrer Ergebnisse die folgenden Bezeichnungen (Tabelle 2).

Tabelle 2

Gewählte Bezeichnung für die Paraoxonasetypen

(nach GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al., 1973)

Serumcholinesterase- Restaktivität (Anti-ChE-Technik)	Serum- paraoxonase- Aktivität	Paraoxonase- typ
niedrig	niedrig	1 - 1
mittel	mittel	2 - 1
hoch	hoch	2 - 2

DUMBACH (1976) konnte an einem großen Untersuchungsmaterial erneut darlegen, daß man die Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \cdot 10^{-8}$ M) in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Aktivität einteilen kann. Die nach KRISCH (1968) gemessene Paraoxonase-Aktivität des mensch-

lichen Serums zeigte eine Mischverteilung von drei Verteilungen. Die bei Serumuntersuchungen an 99 Familien mit 180 Kindern mittels der Anticholinesterase-Technik erhaltenen Ergebnisse wiesen auch eindeutig auf eine Vererbung der Paraoxonasetypen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell hin. Die Verteilung der drei Paraoxonasetypen, bestimmt mit der Anticholinesterase-Technik bei 799 nicht blutsverwandten Personen, stimmt sehr gut mit der Hardy-Weinberg-Regel überein, was für eine Vererbung nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell spricht.

Auch PLAYFER (1976) nimmt eine Vererbung nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell an. Allerdings unterschied er, ebenso wie KRISCH (1968), nur zwei Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonase-Aktivität.

II. PROBLEMSTELLUNG

Bisher wurden Untersuchungen an Familien nur mit der Anti-ChE-Technik (GELDMACHER - v. MALLINCKRODT et al. , 1973) und mit einem spektralphotometrischen Verfahren von PLAYFER (1976) durchgeführt.

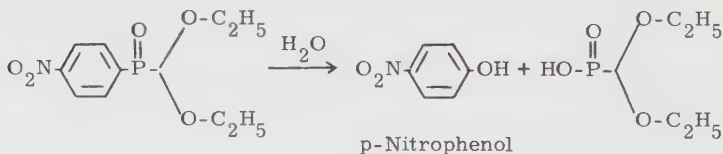
Um hier zusätzlich sichernde Ergebnisse zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Serum-Paraoxonaseaktivitäten bei 25 Familien mit 32 Kindern mit dem kinetischen spektrophotometrischen Test nach KRISCH (1968) bestimmt.

III. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

1. Methodik und Untersuchungsmaterial

Bestimmung der Paraoxonaseaktivität mit einem kinetischen spektrophotometrischen Test nach K. KRISCH (1968).

Mit einem Doppelstrahl-Spektrometer (SHIMADZU UV-200) wurde bei der Wellenlänge 405 nm die Extinktion der durch Hydrolyse entsprechend der folgenden Gleichung freigesetzten Menge an p-Nitrophenol gemessen:



E 600 [= Paraoxon]

[= O, O-Diäthyl-O-(p- nitrophenyl)-phosphat]

Alle Messungen erfolgen bei einer konstanten Temperatur von 25°C und bei pH 11,2.

Man geht so vor, daß man die Extinktion nach 30 Sekunden und nach 180 Sekunden ermittelt. Ausgewertet wird die Extinktionsdifferenz ΔE von 180 minus 30 Sekunden. Von dem so gemessenen Wert wird der unter gleichen Bedingungen gemessene Leerwert (ohne Serum) abgezogen. Sodann wird nach der Formel auf S. 12 die Aktivität berechnet.

a) Herstellung der Lösungen:

Glycin-Natronlauge-Puffer (0,1 M ; pH 11,2)

- 7,507 g Glycin
- ad 1000 ml mit aqua demin.
- mit 35 %iger NaOH mittels pH-Elektrode auf pH 11,2 einstellen.

Tris-Puffer (0,1 M ; pH 8,0)

- 60,570 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
- ad 500 ml mit aqua demin.
- mit rauchender HCl mittels Elektrode auf pH 8,0 einstellen.

E 600 Stammlösung ($1,2 \cdot 10^{-2}$ M in 0,1 M Trispuffer)

- 0,065 ml Paraoxon (99 % rein)
(=O,O -Diäthyl-O-(p- nitrophenyl)- phosphat)
- ad 25 ml mit 0,1 M Trispuffer

E 600 Gebrauchslösung

(E 600 Stammlösung mit aqua demin. 1 : 5 verdünnt)

- 10 ml E 600 Stammlösung
- ad 50 ml mit aqua demin.

Kochsalzlösung (0,9 %ig)

- 9,0 g NaCl
- ad 1000 ml mit aqua demin.

Trispuffer und Glycin-Natronlauge - Puffer werden kühl aufbewahrt;
die E 600 -Stammlösung wird täglich neu angesetzt.

b) Gewinnung des Serums:

Es wurden 25 Familien mit 32 Kindern untersucht. Die Blutentnahme erfolgte mit 10 ml "Sarstedt-Serum-Monovetten" und Einmal-Kanülen der Größe 1 aus der vena cubitalis. Das geronnene Blut wurde bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und die Messungen 12 bis 24 Stunden nach Entnahme durchgeführt. Bei $+4^{\circ}\text{C}$ ist das Enzym über viele Tage haltbar (LINDORF, 1971).

Die Blutproben wurden 15 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch werden sollte, und das Serum abgetrennt.

c) Herstellung der Serumverdünnung:

Das Serum wurde mit 0,9 %iger NaCl-Lösung 1 : 5 verdünnt.
(0,5 ml Serum + 2,0 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung)

d) Versuchsansatz:

In ein Reagenzglas werden pipettiert:

- Glycin-Puffer (pH 11,2) 3,3 ml
- Serum (1 : 5 verdünnt) 0,5 ml
- E 600 Gebrauchslösung 1,0 ml

Sofort nach Zugabe des Serums wurde die Lösung in eine Meßküvette (Schichtdicke 1 cm) gefüllt.

Beim Leerwert wurde an Stelle von Serum 0,5 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung eingesetzt.

Alle Lösungen mußten eine Temperatur von 25°C haben, was durch rechtzeitiges Einstellen in einem Thermostaten erreicht wurde.

e) Messung der Extinktion:

Bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Temperatur von 25°C wird die Extinktion (entsprechend der p-Nitrophenolkonzentration) nach 30 Sekunden und nach 180 Sekunden gemessen.

Von dem so gemessenen Wert wird der unter gleichen Bedingungen gemessene Leerwert (ohne Serum) abgezogen.

Die Paraoxonase-Aktivität wurde bei jedem Serum viermal bestimmt. Dazu wurden zwei Serumverdünnungen angesetzt und bei jeder Verdünnung die Extinktionsdifferenz ΔE zweimal ermittelt.

f) Berechnung der Aktivität:

Die Berechnung der Enzymaktivität beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{E}{d \cdot \epsilon}$$

c. = Konzentration (Mol/l)

E = Extinktion

d = Schichtdicke (cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$)

Bei in Lösung befindlichen Enzymen wird die Volumenaktivität U/l angegeben.

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nMol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH 11,2) zugrunde gelegt.

$$\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,05 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$$

10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach (bei einer Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$ und einer Wellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$) eine Extinktion von 0,1805.

Unter Berücksichtigung des Serumvolumens (Umrechnung auf 1 ml Serum durch Multiplikation mit 2),

der Serumverdünnung (Multiplikation mit 5), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 Min. durch Division durch 2,5)

und des Ansatzvolumens von 4,8 ml (Multiplikation mit 4,8)

errechnet sich die Aktivität (in $\mu\text{Mol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ Serum) nach der Formel

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 4,8 \cdot 10}{0,1805 \cdot 2,5} = \frac{\Delta E \cdot 1063}{(\text{U/l Serum})}$$

Pro Serum wurden vier Messungen durchgeführt. Aus den vier Einzelwerten wurde die mittlere Aktivität $\bar{A}$ berechnet:

$$\bar{A} = \frac{\sum A_n}{n}$$

$\bar{A}$ = mittlere Aktivität (U/l Serum)

$\sum A$ = Summe der Einzelaktivitäten

n = Anzahl der Messungen

2. Ergebnisse

a) Präzision der Methode:

Hierzu wurden für drei Seren mit niedriger, mittlerer und hoher Paraoxonaseaktivität jeweils eine große Anzahl von Messungen - 16 Verdünnungsansätze V_1 bis V_{16} mit mindestens je zwei ΔE - Bestimmungen - nach der spektrophoto-

metrischen Methode von KRISCH (1968) durchgeführt.

Gemessen wurde die Extinktion E nach 30 Sekunden und nach 180 Sekunden. Aus der Extinktionsdifferenz ΔE wurde die Aktivität in U/l Serum mittels der auf Seite 12 wiedergegebenen Formel berechnet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3, 4 und 5 angeführt.

Tabelle 3

Serum-Paraoxonase-Aktivität in U/l Serum bei niedrigem Paraoxonase-Typ (1-1), gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von KRISCH (1968) (16 Verdünnungsansätze $V_1 - V_{16}$ mit 32 Aktivitätsbestimmungen).

Verdünnungs- ansatz V	Extinktion nach 30 Sek.	Extinktion nach 180 Sek.	Extinktions- differenz ΔE	Aktivität in U/l Serum
V_1	0,061	0,130	0,069	73,35
	0,061	0,130	0,069	73,35
V_2	0,059	0,128	0,069	73,35
	0,050	0,115	0,065	69,10
V_3	0,049	0,116	0,067	71,22
	0,045	0,112	0,067	71,22
V_4	0,040	0,109	0,069	73,35
	0,040	0,105	0,065	69,10
V_5	0,035	0,100	0,065	69,10
	0,029	0,098	0,069	73,35
V_6	0,030	0,099	0,069	73,35
	0,020	0,090	0,070	74,41

Forts. Tab. 3 :

Verdünnungs- ansatz V	Extinktion nach 30 Sek.	Extinktion nach 180 Sek.	Extinktions- differenz ΔE	Aktivität in U/l Serum
V ₇	0,020	0,089	0,069	73,35
	0,019	0,080	0,061	64,84
V ₈	0,015	0,084	0,069	73,35
	0,009	0,080	0,071	75,47
V ₉	0,009	0,079	0,070	74,41
	0,010	0,080	0,070	74,41
V ₁₀	-0,005	0,060	0,065	69,10
	-0,010	0,059	0,069	73,35
V ₁₁	-0,012	0,050	0,062	65,91
	+0,010	0,079	0,069	73,35
V ₁₂	0,010	0,079	0,069	73,35
	0,000	0,070	0,070	74,41
V ₁₃	0,000	0,069	0,069	73,35
	0,005	0,070	0,065	69,10
V ₁₄	0,001	0,070	0,069	73,35
	0,000	0,066	0,066	70,16
V ₁₅	0,000	0,069	0,069	73,35
	0,000	0,069	0,069	73,35
V ₁₆	0,000	0,069	0,069	73,35
	0,000	0,064	0,064	68,03

Tabelle 4

Serum-Paraoxonase-Aktivität in U/l Serum bei mittlerem Paraoxonase-Typ (2-1), gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von KRISCH (1968).

(16 Verdünnungsansätze mit 39 Aktivitätsbestimmungen)

Verdünnungs- ansatz V	Extinktion nach 30 Sek.	Extinktion nach 180 Sek.	Extinktions- differenz ΔE	Aktivität in U/l Serum
V ₁	0,094	0,360	0,266	282,76
	0,088	0,355	0,267	283,82
V ₂	0,065	0,335	0,270	287,01
	0,070	0,340	0,270	287,01
	0,068	0,340	0,272	289,14
	0,068	0,339	0,271	288,01
V ₃	0,056	0,315	0,259	275,32
	0,058	0,325	0,267	283,82
	0,056	0,316	0,260	276,38
V ₄	0,048	0,315	0,267	283,82
	0,045	0,314	0,269	285,95
	0,045	0,329	0,274	291,20
V ₅	0,035	0,300	0,265	281,70
	0,030	0,298	0,268	284,88
V ₆	0,020	0,288	0,268	284,88
	0,019	0,286	0,267	283,82
V ₇	0,019	0,285	0,266	282,76
	0,015	0,283	0,268	284,88
	0,009	0,280	0,271	288,07

Forts. Tab. 4:

Verdünnungs- ansatz V	Extinktion nach 30 Sek.	Extinktion nach 180 Sek.	Extinktions- differenz ΔE	Aktivität in U/l Serum
V ₈	0,010	0,276	0,266	282,76
	0,000	0,265	0,265	281,70
V ₉	0,010	0,276	0,266	282,76
	0,009	0,276	0,267	283,82
	0,000	0,260	0,260	276,38
	-0,005	0,255	0,260	276,38
V ₁₀	0,010	0,274	0,264	280,63
	-0,010	0,256	0,266	282,76
V ₁₁	0,018	0,285	0,267	283,82
	0,005	0,275	0,270	287,01
V ₁₂	0,035	0,300	0,265	281,70
	0,036	0,301	0,265	281,70
V ₁₃	0,038	0,304	0,266	282,76
	0,030	0,290	0,260	276,38
V ₁₄	0,038	0,304	0,266	282,76
	0,032	0,297	0,265	281,70
V ₁₅	0,030	0,297	0,267	283,82
	0,030	0,302	0,272	289,14
V ₁₆	0,029	0,296	0,267	283,82
	0,030	0,298	0,268	284,88

Tabelle 5

Serum-Paraoxonase-Aktivität in U/l Serum bei hohem
Paraoxonase-Typ (2-2), gemessen mit der spektrophoto-
metrischen Methode von KRISCH (1968).
(16 Verdünnungsansätze mit 34 Aktivitätsbestimmungen)

Verdünnungs- ansatz V	Extinktion nach 30 Sek.	Extinktion nach 180 Sek.	Extinktions- differenz ΔE	Aktivität in U/l Serum
V ₁	0,140	0,560	0,420	446,46
	0,139	0,562	0,423	449,65
V ₂	0,116	0,532	0,416	442,21
	0,130	0,549	0,419	445,46
V ₃	0,135	0,560	0,425	451,78
	0,120	0,548	0,428	454,96
V ₄	0,115	0,544	0,429	456,03
	0,108	0,534	0,426	452,84
V ₅	0,110	0,535	0,425	451,78
	0,110	0,530	0,420	446,46
	0,100	0,518	0,418	444,33
V ₆	0,098	0,524	0,426	452,84
	0,100	0,528	0,428	454,96
V ₇	0,090	0,516	0,426	452,84
	0,090	0,529	0,430	457,09
V ₈	0,095	0,524	0,429	456,03
	0,079	0,508	0,429	456,03

Forts. Tab. 5 :

Verdünnungs- ansatz V	Extinktion nach 30 Sek.	Extinktion nach 180 Sek.	Extinktions- differenz ΔE	Aktivität in U/l Serum
V ₉	0,076	0,498	0,422	448,59
	0,076	0,502	0,426	452,84
	0,070	0,485	0,415	441,15
V ₁₀	0,065	0,491	0,426	452,84
	0,075	0,496	0,426	452,84
V ₁₁	0,068	0,494	0,426	452,84
	0,058	0,485	0,427	453,90
V ₁₂	0,050	0,474	0,424	450,71
	0,050	0,478	0,428	454,96
V ₁₃	0,045	0,476	0,425	451,78
	0,040	0,468	0,428	454,96
V ₁₄	0,039	0,467	0,428	454,96
	0,039	0,465	0,426	452,84
V ₁₅	0,035	0,461	0,426	452,84
	0,030	0,457	0,427	453,90
V ₁₆	0,029	0,454	0,426	452,84
	0,025	0,450	0,425	451,78

Die Berechnung der mittleren Aktivität $\bar{A}$ erfolgt, wie schon erwähnt, nach der Formel

$$\bar{A} = \frac{\sum A_n}{n}$$

Dabei ist:

$$\begin{aligned}\bar{A} &= \text{mittlere Aktivität (U/l Serum)} \\ \sum A_n &= \text{Summe der Einzelaktivitäten (U/l Serum)} \\ n &= \text{Anzahl der Messungen}\end{aligned}$$

Die mittlere Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert ergibt die Standardabweichung s_x und errechnet sich aus:

$$s_x = \sqrt{\frac{x^2 - (\sum x)^2}{n - 1}}$$

$$\begin{aligned}s_x &= \text{Standardabweichung} \\ x &= \text{Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert} \\ &\quad (x_1 = \bar{A} - A_1 ; \quad x_2 = \bar{A} - A_2 ; \quad \dots) \\ n &= \text{Anzahl der Messungen}\end{aligned}$$

Für den Variationskoeffizienten v schließlich erhält man

$$v = \frac{s_x \cdot 100}{\bar{A}} \quad \%$$

Die Werte für die drei Paraoxonase-Typen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt:

Tabelle 6

Ergebnisse zur Präzision der Methode

niedriger Paraoxonase-Typ 1-1 (vgl. Tab. 3)

n = 32

mittlere Aktivität $\bar{A}$ = 71,99 U/l Serum

Standardabweichung s_x = 2,63

Variationskoeffizient v = + 3,66 %

mittlerer Paraoxonase-Typ 2-1 (vgl. Tab. 4)

n = 39

mittlere Aktivität $\bar{A}$ = 283,38 U/l Serum

Standardabweichung s_x = 3,68

Variationskoeffizient v = + 1,30 %

hoher Paraoxonase-Typ 2-2 (vgl. Tab. 5)

n = 34

mittlere Aktivität $\bar{A}$ = 451,71

Standardabweichung s_x = 3,99

Variationskoeffizient v = + 0,88 %

b) Typeneinteilung:

Bei einer Untersuchung, die GELDMACHER - v. MALLINCK-RODT et al. 1973 an 257 Personen nach der Methode von KRISCH (1968) durchführten, ließen sich drei Gruppen mit unterschiedlicher Paraoxonase-Aktivität abgrenzen (siehe Tab. 7).

Dabei ergab sich folgende Einteilung:

Tabelle 7

Serum-Paraoxonase-Aktivität von 257 menschlichen Seren in U/l, gemessen mit der spektrophotometrischen Methode von KRISCH (1968).

(Nach GELDMACHER- v. MALLINCKRODT et al., 1973)

n 257	Gruppe	Paraoxonase-Aktivität (U/l Serum)	
		gemessene Werte	mittlere Aktivität mit Standardabweichung
132	1 - 1	30-189	97,1 $\pm$ 36,3
97	2 - 1	190-350	262,3 $\pm$ 41,4
28	2 - 2	> 350	449,6 $\pm$ 79,4

c) Meßergebnisse bei den Familien:

Die an den 25 Familien mit 32 Kindern gewonnenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Für die Zuordnung zu den 3 Paraoxonase-Typen aufgrund der gemessenen Aktivitäten wurde entsprechend Tab. 7 vorgegangen.

Tabelle 8

Mittlere Serum-Paraoxonaseaktivität in U/l Serum
und Paraoxonase-Typ bei Familien - gemessen mit
der spektrophotometrischen Methode von KRISCH (1968).

Familie	Alter	mittlere Serum- Paraoxonase-Aktivi- tät (U/l Serum)	Paraoxonase- Typ
<u>Hör</u>			
Vater	70	62,2	1-1
Mutter	54	119,4	1-1
Sohn M.	24	161,6	1-1
<u>Gersching</u>			
Vater	59	56,1	1-1
Mutter	52	50,2	1-1
Sohn W.	24	56,1	1-1
<u>Weimer</u>			
Vater	61	54,7	1-1
Mutter	57	47,3	1-1
Sohn R.	23	56,3	1-1
<u>Sessner</u>			
Vater		63,5	1-1
Mutter		61,4	1-1
Sohn		64,6	1-1
Tochter		63,3	1-1
<u>Fiederling</u>			
Vater	57	51,3	1-1
Mutter	55	70,6	1-1
Tochter C.	23	89,0	1-1

Forts. Tab. 8 :

Familie	Alter	mittlere Serum-Para- oxonase-Aktivität (U/l Serum)	Para- oxonase- Typ
<u>Hörner</u>			
Vater	86	28,7	1-1
Mutter	82	39,6	1-1
Tochter E.	55	71,0	1-1
<u>Robbe</u>			
Vater	66	180,2	1-1
Mutter	64	74,2	1-1
Sohn K.	37	53,1	1-1
<u>Krause</u>			
Vater	47	72,3	1-1
Mutter	46	72,6	1-1
Sohn G.	21	57,1	1-1
<u>Swoboda</u>			
Vater	57	70,2	1-1
Mutter	52	62,7	1-1
Sohn U.	23	64,1	1-1
<u>Michler</u>			
Vater	47	66,9	1-1
Mutter	48	44,4	1-1
Tochter A.	11	59,5	1-1
<u>Schmidt</u>			
Vater	51	176,7	1-1
Mutter	47	54,2	1-1
Tochter B.	19	65,1	1-1

Forts. Tab. 8:

Familie	Alter	mittlere Serum-Para- oxonase-Aktivität (U/l Serum)	Para- oxonase- Typ
<u>Heinzl</u>			
Vater	57	63,5	1-1
Mutter	55	52,9	1-1
Sohn R.	28	53,9	1-1
<u>Berthold</u>			
Vater	62	175,1	1-1
Mutter	61	87,4	1-1
Sohn W.	21	173,8	1-1
<u>Porst</u>			
Vater	57	48,6	1-1
Mutter	52	73,6	1-1
Tochter A.	18	88,8	1-1
<u>Schück</u>			
Vater	61	74,4	1-1
Mutter	55	90,6	1-1
Sohn R.	25	98,6	1-1
<u>Paul</u>			
Vater	64	212,6	2-1
Mutter	59	61,9	1-1
Sohn K.	30	207,0	2-1
Sohn A.	27	198,2	2-1
Sohn F.	24	216,0	2-1
Tochter G.	22	49,4	1-1
Sohn H.	20	44,2	1-1

Forts. Tab. 8:

Familie	Alter	mittlere Serum-Para- oxonase-Aktivität (U/l Serum)	Para- oxonase- Typ
<u>Sailer</u>			
Vater	59	216,6	2-1
Mutter	54	64,6	1-1
Sohn W.	17	208,1	2-1
<u>Schweizer</u>			
Vater	43	168,5	1-1
Mutter	42	219,8	2-1
Sohn G.	19	223,8	2-1
<u>Koller</u>			
Vater	47	209,7	2-1
Mutter	45	55,8	1-1
Sohn S.	21	242,9	2-1
<u>Seeger</u>			
Vater	61	237,6	2-1
Mutter	56	63,8	1-1
Tochter R.	22	217,7	2-1
<u>Dießner</u>			
Vater	38	80,5	1-1
Mutter	32	287,5	2-1
Sohn S.	13	218,6	2-1
<u>Ille</u>			
Vater	61	47,3	1-1
Mutter	57	451,7	2-2
Tochter Ha.	32	287,5	2-1
Tochter He.	22	283,4	2-1

Forts. Tab. 8:

Familie	Alter	mittlere Serum-Para- oxonase-Aktivität (U/l Serum)	Para- oxonase- Typ
<u>Zecha</u>			
Vater	53	170,9	1-1
Mutter	51	410,7	2-2
Sohn D.	23	212,1	2-1
<u>Riedner</u>			
Vater	52	219,0	2-1
Mutter	46	201,1	2-1
Tochter I.	23	234,1	2-1
Tochter E.	19	390,9	2-2
<u>Förster</u>			
Vater	52	355,0	2-2
Mutter	52	218,9	2-1
Sohn R.	23	314,1	2-1

d) Zusammenfassung der Meßergebnisse:

Die Ergebnisse der Familienuntersuchungen sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Sie widersprechen in keinem Fall der angenommenen Vererbung der Paraoxonase-Typen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell.

Tabelle 9

Serum-Paraoxonase-Typen bei 25 Familien mit 32 Kindern - bestimmt mit dem spektrophotometrischen Verfahren nach KRISCH (1968).

<u>Eltern</u>		<u>Kinder</u>		
Paarungen	Familien	Paraoxonase-Typ		
		1-1	2-1	2-2
	n	n	n	n
1-1 x 1-1	15	16	-	-
1-1 x 2-1	6	2	8	-
1-1 x 2-2	2	-	3	-
2-1 x 2-1	1	-	1	1
2-1 x 2-2	1	-	1	-
2-2 x 2-2	-	-	-	-
	25	18	13	1

IV. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der Serum-Aryl-esterase (EC 3.1.1.2) bei Familien untersucht.

Mit dem spektrophotometrischen Test nach KRISCH (1968) wurde bei 25 Familien mit 32 Kindern das Ausmaß der Paraoxon-Spaltung bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Die nach Tabelle 7 festgelegten Grenzen für die drei Aktivitätsgruppen, nämlich 30 - 189 U/l, 190 - 350 U/l und > 350 U/l, ließen eine eindeutige Zuordnung der Typen zu, wobei die Zuordnung innerhalb der Familienkonstellation keinen Widerspruch zu der angenommenen Vererbung der Paraoxonase-Typen nach einem einfachen Zwei-Allele-Modell erbrachten.

Die Präzision der Methode erwies sich als gut (Variationskoeffizient $\pm 3,66\%$, $\pm 1,30\%$ bzw. $\pm 0,88\%$ - nach Seite 20).

Um die Ergebnisse unserer Untersuchungen noch mehr abzusichern, wären weitere Familien-Untersuchungen nötig, besonders vergleichende Untersuchungen durch Kombination von Anti-ChE - Technik (GELDMACHER- v. MALLINCKRODT et al., 1969) und direkter spektrophotometrischer Methode nach KRISCH (1968).

V. LITERATURVERZEICHNIS

ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

ALDRIDGE, W.N.:

Serumesterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenylphosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

AUGUSTINSSON, K.-B., HEIMBÜRGER, G.:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

Biochem. biophys. Acta (Amst.) 13, 303 (1954)

AUGUSTINSSON, K.-B.:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

IV. Specificity studies.

Acta chem. scand. 8, 1533 (1954)

AUGUSTINSSON, K.-B., HEIMBÜRGER, G.:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterases by organophosphorus compounds in vitro.

Acta chem. scand. 9, 310 (1955)

DUMBACH, J.:

Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serum-paraoxonase (E C. 3.1.1.2).

Dissertation, Erlangen, 1976

ERDÖS, E.G., BOGGS, L.E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

Nature (Lond.) 190, 716 (1961)

FRIEDBERG, K.D., ERDMANN, W.D.:

Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.

Arch. exp. Path. Pharmacol. 237, 1 (1959)

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., RABAST, U.,
LINDORF, H.H.:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W.,
PÉTÉNYI, M., BURGIS, H., LINDORF, H.H.,
METZNER, H.:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 353, 217 (1972)

GELDMACHER- v. MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PÉTÉNYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, T., HILLER, T.:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase (E C 3.1.1.2).

Humangenetik 17, 331 (1973)

JUPAC - JUB - Commission on Biochemical Nomenclature (CBN):

Nomenklatur multipler Enzymformen,

Empfehlungen 1971

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 852 (1972)

KRISCH, K. :

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

LINDORF, H. H. :

Untersuchungen zur Ursache der unterschiedlichen Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Di-äthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat).

Dissertation, Erlangen 1971

MAIN, A. R. :

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (paraoxon) in sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

MAZUR, A., BODANSKY, O. :

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate.

J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)

MAZUR, A., BODANSKY, O. :

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl-fluorophosphates.

J. Biol. Chem. 164, 271 (1946 b)

MOUNTER, L. A. :

Some studies of enzymatic effects of rabbit serum.

J. biol. Chem. 209, 813 (1954)

NEAL, R. A. :

Studies on the metabolism of diethyl-4-nitrophenyl-phosphorothionate (Parathion) in vitro.

Biochem. J. 103, 183 (1967)

PLAYFER, J.R., EZE, L.C., BULLEN, M.F.,

EVANS, D.A.P.:

Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma
paraoxonase activity.

J. Med. Genet. 13, 337 (1976)

SCHAUMANN, W., SCHILLER, M.:

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum.

Arch. exp. Path. Pharmacol. 239, 114 (1960)

SKRINJARIC - SPOLJAR, M., REINER, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenyl-phosphate and ethyl-p-
nitrophenyl-ethyl-phosphate by human sera.

Biochem. biophys. Acta (Amst.) 165, 289 (1968)

ZÜRCHER, K.:

Über die enzymatische Hydrolyse von Organophosphaten.

Dissertation, Göttingen 1971

Herrn Professor Dr. H. -B. Wuermeling danke ich für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut und die freundliche Übernahme des Korreferats.

Besonders danken möchte ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher - v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats und ihre überaus große Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Am 26. April 1952 wurde ich, Frank PAUL, als drittes von fünf Kindern des Diplomvolkswirtes Gottfried Paul und seiner Ehefrau Charlotte Paul, geb. Beyer, in Oldenburg i.O. geboren.

Aufgewachsen bin ich in Nürnberg, wohin meine Familie 1953 übersiedelte. Hier besuchte ich von 1958 - 1962 die Volksschule und danach das Martin-Behaim-Gymnasium. Im Juni 1971 bestand ich die Reifeprüfung an dieser Schule.

Im W.S. 71/72 studierte ich zunächst ein Semester Physik in Erlangen. Im Sommer 1972 begann ich mit dem Medizinstudium in Würzburg. Hier legte ich im W.S. 72/73 das Vorphysikum und im S.S. 74 das Physikum ab.

Zum W.S. 74/75 wechselte ich an die Universität Erlangen, wo ich im März 1976 den I. Abschnitt und im August 1977 den II. Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand.

Am 10. Oktober 1978 bestand ich den schriftlichen Teil und am 20. November 1978 den mündlichen Teil des III. Abschnittes der ärztlichen Prüfung in Erlangen.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197